

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-233056

(43) 公開日 平成7年(1995)9月5日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/165	A E D	9454-4 C		
	A B N			
31/195	A B R	9454-4 C		
	A C F			
31/44	A B E			

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-208320

(22) 出願日 平成6年(1994)9月1日

(31) 優先権主張番号 特願平5-219854

(32) 優先日 平5(1993)9月3日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平5-332338

(32) 優先日 平5(1993)12月27日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72) 発明者 田中 淳二

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第

一製薬株式会社東京研究開発センター内

(72) 発明者 増元 浩

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第

一製薬株式会社東京研究開発センター内

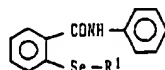
(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54) 【発明の名称】 リボキシゲナーゼ阻害剤

(57) 【要約】

【構成】 一般式 (1) 【式中、R¹ は環状アルキルチオ基、2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ基及びこれから誘導される基、システイン残基を有するペプチド若しくは蛋白質であってシステインの硫黄原子を介して結合する基、又は R²-Se- (ここで R² は有機基を示す) で表わされる基を示す】 で表わされるセレン化合物又はその塩を有効成分とするリボキシゲナーゼ阻害剤。

【化1】



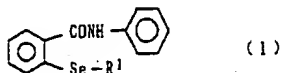
(1)

【効果】 セレン化合物 (1) 又はその塩は、強力なりボキシゲナーゼ阻害活性を有し、安全性も高く、かつ水溶性であることから経口及び非経口投与でリボキシゲナーゼの代謝物が障害の発現に関与する疾患の予防又は治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の一般式(1)

【化1】



〔式中、 R^1 は環状アルキルチオ基、2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ基及びこれから誘導される基、システイン残基を有するペプチド若しくは蛋白質であってシステインの硫黄原子を介して結合する基、又は R^2 -Se- (ここで R^2 は有機基を示す) で表わされる基を示す〕で表わされるセレン化合物又はその塩を有効成分とするリボキシゲナーゼ阻害剤。

【請求項2】 R^2 -Se-で表わされる基が、次の群より選ばれる基である請求項1記載のセレン化合物又はその塩を有効成分とするリボキシゲナーゼ阻害剤。2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン基、2-ピリジン-3-イル-カルバモイル-フェニルセレン基、2-フェニルカルバモイル-ベンジルセレン基、2-ピリジン-3-イル-カルバモイル-ベンジルセレン基、3-フェニルカルバモイル-フェニルセレン基、3-ピリジン-3-イル-カルバモイル-フェニルセレン基、3-フェニルカルバモイル-ベンジルセレン基、3-ピリジン-3-イル-カルバモイル-ベンジルセレン基、4-フェニルカルバモイル-フェニルセレン基、4-ピリジン-3-イル-カルバモイル-フェニルセレン基、4-フェニルカルバモイル-ベンジルセレン基、4-ピリジン-3-イル-カルバモイル-ベンジルセレン基 (これらの基のフェニルカルバモイル基中のフェニル基は置換基を有していてもよい。)

【請求項3】 セレン化合物が、S- (2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン) アルブミンである請求項1記載のリボキシゲナーゼ阻害剤。

【請求項4】 セレン化合物が、S- (2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン) ヒトアルブミンである請求項1記載のリボキシゲナーゼ阻害剤。

【請求項5】 セレン化合物が、S- (2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン) ヒト血清アルブミンである請求項1記載のリボキシゲナーゼ阻害剤。

【請求項6】 セレン化合物が、2- (2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン) セレン-N-フェニルベンズアミドである請求項1記載のリボキシゲナーゼ阻害剤。

【請求項7】 セレン化合物が、S- (2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン) システインである請求項1記載のリボキシゲナーゼ阻害剤。

【請求項8】 セレン化合物が、S- (2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン) グルタチオンである請求項1記載のリボキシゲナーゼ阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はリボキシゲナーゼ阻害剤に関し、更に詳細には多価不飽和脂肪酸の過酸化酵素であるリボキシゲナーゼを阻害することにより、各種リボキシゲナーゼ代謝物が原因となる疾患、例えば虚血性脳疾患、クモ膜下出血等の脳血管障害、虚血性心疾患、気管支喘息、腫瘍、各種炎症及びエンドトキシンショック等を予防又は治療するための医薬に関する。

【0002】

10 【従来の技術】 リボキシゲナーゼは、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸を初めとした多価不飽和脂肪酸を基質として、その過酸化物を生成する酵素である。そして、アラキドン酸を基質とした場合には、ロイコトリエン類、ハイドロパーオキシテトラエン酸類等の強い生理活性を有する酸化代謝物を生成する。これらのリボキシゲナーゼ代謝物は、強い血管収縮作用、血管透過性亢進作用、白血球遊走作用、気管平滑筋収縮作用、腫瘍のプロモーション促進等を示すことが知られている [M.

A. Bray, Agents and Actions 19 (1986) 87-89, B. Samuelson, Science 220 (1983) 568-575, 山本慧; 日本薬理学雑誌 101 (1993) 349-361]。また、脳梗塞 [R. J. Dempsey, et al., Neurol. Res. 8 (1986) 53-63]、クモ膜下出血 [K. J. Kiwak, et al., J. Neurosurg., 62 (1985) 865-869] 等の脳血管障害、虚血性心疾患 [M. Carry, et al., Circulation 85 (1992) 230-236]、喘息 [J. R. Ockach "Leukotrienes and lipoxygenase" by Elsevier, 1989]、腫瘍のプロモーションの阻害 [山本慧; 日本薬理学雑誌 101 (1993) 349-361]、炎症 [B. Samuelson, Science 220 (1983) 568-575] 及びエンドトキシンショック [J. R. Parrat, In Handbook of Endotoxin Vol. 2, 203-236 by Elsevier Science, 1985] 等を初めとした種々の疾病において、リボキシゲナーゼが活性化され、その代謝物が上昇することにより、種々の障害が惹起されることが明らかにされている。即ち、このリボキシゲナーゼを阻害することによりリボキシゲナーゼ代謝物の上昇を抑制することは、これら疾病での障害を改善することとなる。また、これらの疾患は、急性期への適用がより有効であることから、投与後速やかに有効血中濃度を達成するため、注射剤として製剤化できる方がより有用性が高いものと考えられていた。そこで、注射剤を初めとした医薬製剤としての使用に耐え得る安全で強力なリボキシゲナーゼ阻害活性を有する化合物が望まれていた。

【0003】かかる観点からリボキシゲナーゼ阻害剤の探索が広く行われており、強いリボキシゲナーゼ阻害性を有する化合物として、2-フェニル-1, 2-ベンズイソセレンアゾール-3 (2H)-オン (一般名: エプセレン) が開発され、臨床応用されている [Peter Kuhl, et al., Prostaglandins 31 (1986) 1029-1048]。しかし、この化合物は、水に対する溶解度が約20 μMと難溶性であり、注射剤として用いることはできず、経口剤としてのみ用いられている。

【0004】また、従来、リボキシゲナーゼ阻害薬として開発された他の化合物についても、メトヘモグロビンを生成する等の安全性の点に問題が残されているか、あるいは、物性に問題があった。それに伴い経口投与した場合、そのバイオアベイラビリティが低い、あるいは、注射剤にできない等の欠点を有しており、安全性が高く、水溶性で強いリボキシゲナーゼ阻害性を有するリボキシゲナーゼ阻害剤はほとんどなかった [R.-M. McMillan et al., TIPS, 13 (1992) 322-330]。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は優れたリボキシゲナーゼ阻害性を有し、水に対する溶解性が良好で、かつ安全性の高いリボキシゲナーゼ阻害剤を提供することにある。

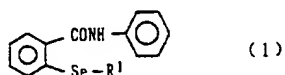
【0006】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは薬理活性、安全性及び水への溶解性等を指標にして検討した結果、後記式(1)で表わされるセレン化合物又はその塩が前記エプセレンに比べて強いリボキシゲナーゼ阻害性を有し、水溶性で、かつ安全性も高いことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は次の一般式(1)

【0008】

【化2】



【0009】【式中、R¹は環状アルキルチオ基、2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ基及びこれから誘導される基、システイン残基を有するペプチド若しくは蛋白質であってシステインの硫黄原子を介して結合する基、又はR²-Se- (ここでR²は有機基を示す) で表わされる基を示す】で表わされるセレン化合物又はその塩を有効成分とするリボキシゲナーゼ阻害剤を提供するものである。

【0010】本発明リボキシゲナーゼ阻害剤の有効成分であるセレン化合物を示す一般式(1)中、R¹で示される環状アルキルチオ基としては炭素数3~8の環状アルキル基が挙げられ、具体例としてはシクロプロピルチ

オ基、シクロブチルチオ基、シクロペンチルチオ基、シクロヘキシルチオ基、シクロヘプチルチオ基、シクロオクチルチオ基等が挙げられる。2-アミノ-2-カルボキシエチルチオ基及びこれから誘導される基としては、システインのチオール基が結合に関与したもの、2-アミノ-2-アルコキシカルボニルエチルチオ基 (この基の中のアルコキシ基としては炭素数1~8のアルコキシ基、例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基、ヘキシルオキシ基等が挙げられる)、2-アシルアミド-2-カルボキシエチルチオ基 (この基の中のアシル基としては炭素数1~8のアシル基、例えばホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、ベンゾイル基等が挙げられる) 及び2-アシルアミド-2-アルコキシカルボニルエチルチオ基 (この基の中のアルコキシ基及びアシル基としては上記のものが挙げられる) が挙げられる。また、システイン残基を有するペプチドとしては、L-システイン、グリシン、グルタチオン、カルシトニン、コエンザイムA等が挙げられる。システイン残基を有する蛋白質としては、種々の水溶性蛋白質、例えばグルタチオンパーオキシダーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アルブミン等が挙げられる。アルブミンとしては、ヒト、ウシ等のアルブミンが挙げられ、好ましくはヒト血清アルブミンが挙げられる。R²-Se-で示される基 (R²は有機基を示し、ここで言う有機基とは有機化合物から導かれた置換基を示す。) としては、2-フェニルカルバモイル-フェニルセレンル基、2-ピリジン-3-イル-カルバモイル-フェニルセレンル基、2-フェニルカルバモイル-ベンジルセレンル基、2-ピリジン-3-イル-カルバモイル-ベンジルセレンル基、3-フェニルカルバモイル-フェニルセレンル基、3-ピリジン-3-イル-カルバモイル-フェニルセレンル基、3-フェニルカルバモイル-ベンジルセレンル基、3-ピリジン-3-イル-カルバモイル-フェニルセレンル基、4-フェニルカルバモイル-ベンジルセレンル基、4-ピリジン-3-イル-カルバモイル-フェニルセレンル基、4-フェニルカルバモイル-ベンジルセレンル基、4-ピリジン-3-イル-カルバモイル-ベンジルセレンル基等が挙げられる。以上に挙げた、フェニルカルバモイル基中のフェニル基は種々の置換基で置換されていてもよい。この置換基として、炭素数1~8のアルキル基、水酸基、炭素数1~8のアルコキシ基 (例えばメトキシ基) アミノ基、ニトロ基、カルボキシ基等が挙げられる。

【0011】また、セレン化合物(1)の塩としては、生理学的に許容される塩であれば特に制限されないが、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩等の酸付加塩; ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、亜鉛塩、リチウム塩、アルミニウム塩、鉄塩等の金属塩等が挙げられる。

【0012】セレン化合物(1)又はその塩はいずれも既知の化合物であり、例えばH. Fischer and N. Dereu, Bull. Soc. Chim. Belg., 96, (1987) 757-768に記載の方法に準じて合成することができる。

【0013】またセレン化合物(1)又はその塩のうち、R¹がS-アルブミンである化合物、R¹がS-グルタチオニル基である化合物及びR¹が2-フェニルカルバモイル-フェニルセニル基である化合物は前記エブセレンの代謝産物として知られている[H. Fischer et al., Xenobiotica 18 (1988) 1347-1359, H. Nomura et al., Selenium in Biology and Medicine (1989) 145-151]。しかし、これらの化合物のリボキシゲナーゼ阻害活性については、従来全く知られていない。

【0014】これらのセレン化合物(1)又はその塩は優れたリボキシゲナーゼ阻害活性を有し、しかもその作用はエブセレン(IC₅₀=20~30 μM) [Peter Kuhl, et al., Prostaglandins 31 (1986) 1029-1048] に比べて強いものである。就中、R¹がS-アルブミンである化合物(1)は、特に優れたリボキシゲナーゼ阻害活性を有する。薬物が蛋白との結合形になった場合には薬理作用は消滅するか又は減弱するのが一般的であることから[北川晴雄、野口照久、伊藤隆太編、「くすりの代謝」(南江堂)(1971年) p 81-107; 村田敏郎、有田隆一編「生理薬理学」(南江堂)(1975年) p 242-250; 青木幸一郎、高木俊夫、寺田弘編、「血清アルブミン-生体におけるその役割」(講談社サイエンティフィック)(1984年) p 131-160]、この化合物がエブセレンよりも強いリボキシゲナーゼ阻害作用を有することは全く驚くべきことである。また、セレン化合物(1)又はその塩は、安全性も高く、かつ水溶性であり、吸収性も良好である。

【0015】本発明のリボキシゲナーゼ阻害剤の具体的な適用疾患としては、脳梗塞等の虚血性脳疾患、クモ膜下出血、虚血性心疾患、気管支喘息、腫瘍、各種炎症性疾患及びエンドトキシンショック等が挙げられる。

【0016】本発明リボキシゲナーゼ阻害剤は、前記のように水溶性、吸収性ともに良好であるため、経口投与、非経口投与のいずれでも投与可能であるが、静脈内投与が特に好ましい。またその剤型としては錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤の調製にあたっては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、溶解剤等の添加剤を使用することができる。

【0017】本発明リボキシゲナーゼ阻害剤の投与量は症状、体重等によって異なるが、経口投与、更に注射等の非経口投与の場合通常成人1人当たり0.05~10

00mg/日であり、好ましくは経口投与で30~300mgであり、非経口投与では10~100mgである。単一投与、持続投与又はいくつかの分割投与、好ましくは1日につき2~3回に分割して投与される。

【0018】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるものではない。

【0019】実施例1

S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセノ) ウシ血清アルブミンの合成: 2.4gのウシ血清アルブミン(フラクション V)を60mlの蒸留水に溶解し、4%w/vの溶液を調製する。これに20.1mgの2-フェニル-1, 2-ベンズイソセナゾール-3(2H)-オンを1mlのジメチルホルムアミドに溶解したものを徐々に加え、攪拌する。最初溶液は白濁するが、すぐに透明となる。反応溶液は室温で15分放置した後、蒸留水で平衡化したセファデックスG-25ゲル濾過カラム(57.2g、内径4.5cm、高さ15cm)にアブライする。溶出溶媒として蒸留水をカラムに流し、蛋白分画を集める。この蛋白分画の一部をとり、エルマン反応によるチオール基の定量(Ellman, Arch. Biochem. Biophys., 82, (1959) 70-77.)を行うとチオール基は検出限界以下である。蛋白分画を真空凍結乾燥し、白色フレーク状固体として目的物を得る。収量: 2.22g(収率 92%)。この固体の一部をとり、蒸留水に溶解した後、上記と同様にチオール基の定量を行うと、チオール基は検出限界以下である。上記で得られた固体を4%w/vとなるようにリン酸緩衝液(pH 7.4, 0.1M)に溶解し、これにジチオスレイトールを5mMになるように加え、37℃で10分間インキュベーションする。反応液の一部をリン酸緩衝液で平衡化したセファデックスG-25ゲル濾過カラムにアブライし、溶出溶媒としてリン酸緩衝液をカラムに流し、蛋白分画を集める。この蛋白分画の一部をとり、エルマン反応によるチオール基の定量を行うと、同濃度のアルブミンについて同様の処理を行ったときとほぼ同量のチオール基が確認できる。これはS-(フェニルカルバモイル-フェニルセノ)アルブミンのセノスルフィド結合がジチオスレイトールによって還元的に切断されて蛋白のチオール基が回復したことによるものである。アニリン部分を¹⁴Cで放射標識した2-¹⁴C-フェニル-1, 2-ベンツイソセナゾール-3(2H)-オンを用いて、上記と同様にしてS-(2-¹⁴C-フェニルカルバモイル-フェニルセノ)ウシ血清アルブミンを調製する。これを4%w/vとなるようにリン酸緩衝液に溶解し、これにジチオスレイトールを10mMになるように加え、37℃で1時間インキュベーションする。反応液を室温に冷却後、その1.0mlを取り、デキストラン炭末(デキストランT7

0、100mgと活性炭粉末、1.0gをリン酸緩衝液100mlに懸濁させたもの)、1.0mlを加え、攪拌後、室温で1.5時間放置する。これにより、ジチオスレイトール処理で遊離した化合物(2-¹⁴C-フェニルカルバモイル-フェニルセレンに相当)を活性炭に吸着させる。反応液を遠心分離した後の上清の蛋白溶液中には放射能はほとんど存在しない。ジチオスレイトールを加えないで上記と同様の操作を行うと、放射能はほとんど活性炭に吸着されず、ほぼ定量的に蛋白溶液中に残存する。これらの事実はエプセレンとウシ血清アルブミンとの反応において、2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン基がアルブミンのチオール基とセレンスルフィド結合を介して結合していることを示す。

【0020】実施例2

リボキシゲナーゼ阻害活性の測定: リボキシゲナーゼ阻害活性の測定は、ホルマン、アール、ティー、(Holman, R. T.)の方法(メソッド オブ バイオケミカル アナリシス; Methods of Biochemical Analysis, Vol. II, 113 (1958))にほぼ準拠した。即ち、一定濃度(最終濃度500単位/3.0ml)のリボキシゲナーゼを含む0.2Mのホウ酸緩衝液に最終濃度が0.1から20*

*0.1μMとなる様に被検化合物を加えた。更に、基質として、一定量のリノール酸を加え、酵素反応を開始した。酵素反応開始より1分から3分までの間に、リボキシゲナーゼにより生成するリノール酸の過酸化物に由来する234nmの吸光度の上昇の抑制を測定することにより、各被検化合物のリボキシゲナーゼ阻害活性を測定した。対照群としては、被検化合物を加えない反応群を使用した。また、リボキシゲナーゼの代わりにその溶媒のみを加えた反応群を負の対照群として使用した。更に、S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)ウシ血清アルブミンの対照群として同濃度のウシ血清アルブミンも測定した。更に、リボキシゲナーゼ阻害活性を有することが知られている3,4-ジヒドロキシケイ皮酸[J. Rockach "Leukotrienes and Lipoxygenase" by Elsvier, 1989]を同様に測定し、その活性を比較した。なお、統計学的有意性の評価は、Student/Welchのt-検定を用い実施した。結果を表1に示した。なお、数値は平均値±SEMで示した。

【0021】

【表1】

実験群	濃度(μM)	吸光度の上昇(A _{234nm})(%)	例数
対照群	-	100	5-6
リボキシゲナーゼ非添加群	-	-2.1±0.8***	5
S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)シクロヘキサントチオール	1.0	92.1±2.4*	5
S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)システイン	1.0 3.0 10	90.4±1.3** 85.6±1.6*** 32.6±2.6***	4 4 4
S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)グルタチオン	0.1 1.0	75.8±2.5* 76.3±4.1**	4 4
S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)ウシ血清アルブミン	0.1 1.0	81.5±3.7* 56.5±3.3***	4 4
ウシ血清アルブミン	1.0	85.9±4.5	4
2-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)セレン-N-フェニルベンズアミド	0.1 1.0 10	95.7±3.7 88.0±4.8 73.9±4.8*	4 4 4
3,4-ジヒドロキシケイ皮酸	100 200	96.6±2.1 90.8±2.0**	5 5

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 対 対照群

***p<0.01 対 ウシ血清アルブミン群

【0022】実施例3

S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)ヒト血清アルブミンの合成: ウシ血清アルブミンに代えてヒト血清アルブミン(シグマ社製、フラクションV)を用いる以外は実施例1と同様にしてS-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)ヒト血清アルブミンを合成した。

【0023】実施例4

リボキシゲナーゼ阻害活性の測定: 実施例2とほぼ同様にして、S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレン)ヒト血清アルブミンのリボキシゲナーゼ阻害活性を評価した結果を表2に示す。表2から明らかなように、濃度依存的なリボキシゲナーゼ阻害活性が認められ、0.1μM以下の濃度においても著明なリボキシゲ

ナーゼ活性を示した。

【0024】

【表2】

濃度 (μM)	234nmの吸光度の上昇の割合 (%)	例数
0 (対照群)	100	5
0.095	61.3±1.42(S.D.)***	4
0.29	53.2±4.16 **	5
0.95	16.6±11.0***	5

***p<0.001, **p<0.005 対 対照群

【0025】実施例5

急性毒性の評価：

(1) 8週齢のウィスター系雄性ラット4匹に、1 g/kg/3mlのS-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレノ)ウシ血清アルブミンの生理食塩水溶液を静脈内に投与し、その後24時間まで観察した。全例特記*

* べき副作用と思われる症状は認められず、24時間後まで全例生存した。

【0026】(2) ddY系雄性マウス5匹(体重36.2~46.9g)に、1 g/kg/3mlのS-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレノ)ヒト血清アルブミンの生理食塩水溶液を静脈内に投与し、その後48時間まで観察した。全例特記すべき副作用と思われる症状は認められず、投与後48時間まで全例生存した。

【0027】

10 【発明の効果】セレン化合物(1)又はその塩は、強力なりボキシゲナーゼ阻害活性を有し、安全性も高く、かつ水溶性であることから経口及び非経口投与でリボキシゲナーゼの代謝物が障害の発現に関与する疾患、例えば虚血性脳疾患、クモ膜下出血等の脳血管障害、虚血性心疾患、気管支喘息、腫瘍、各種炎症及びエンドトキシンショック等の予防又は治療に有用である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A61K 31/44

// C07C 391/02

識別記号

ADU

庁内整理番号

7106-4H

FI

技術表示箇所